茶皂素对奶牛瘤胃原虫区系的影响

赵士萍[1] 严淑红[1] 蒋琦晖[1] 常肖肖[1] 王 炳[1] 方洛云[1] 蒋林树[1*] 熊本海[2*]

（1.北京农学院动物科学技术学院，奶牛营养学北京市重点实验室，北京 102206；2.中国农业科学院畜牧研究所，北京 100193）

摘 要：本研究旨在研究茶皂素对奶牛瘤胃原虫区系的影响。选取 12 头健康荷斯坦奶牛[体重（550±30） kg，产奶量 35 kg/（头·d），胎次 2~4]，随机分为 4 组，每组 3 头，均饲喂基础饲粮，分别于晨饲前灌服 0（对照）、20、30、40 g/（头·d）的茶皂素。试验期 49 d，其中预试期 14 d，正试期 35 d，正试期内每 7 d 于晨饲前 1 h 用口腔采样器采集瘤胃液。采用聚丙烯酰氨凝胶电泳（DGGE）结合 18S rDNA 序列分析技术研究瘤胃原虫区系的变化。结果表明：1）添加茶皂素可以选择性地抑制瘤胃中原虫的生长。2）与对照组相比，30、40 g/(头·d)茶皂素组的丰富度指数和香农多样性指数都显著降低（P<0.05），优势度指数显著增加（P<0.05），但是均一性指数无显著变化（P>0.05）；茶皂素显著减少了瘤胃中前庭亚纲内毛目的原虫数量。综上所述，饲粮中添加 30、40 g/(头·d)茶皂素均可抑制奶牛瘤胃原虫的生长，并且降低瘤胃原虫的多样性。

关键词：奶牛；原虫区系；茶皂素

中图分类号：S816.7;S823

反刍动物瘤胃中含有大量的原虫，原虫在反刍动物的发酵过程中具有重要的作用。原虫通过将淀粉与可溶性糖同化，以聚糊精的形式储存起来，从而降低瘤胃中纤维素的含量，

收稿日期：2016-09-01

基金项目：“十二五”国家科技支撑项目（25012BAD14B09）；“十三五”国家重大科技专项（2016YFDO70020）及（2016YFDO700205）；北京市农业局北京市现代农业产业技术体系奶牛创新团队

作者简介：赵士萍(1990-)，女，云南腾冲人，硕士研究生，研究方向为反刍动物营养。E-mail： 1243830639@qq.com

*通信作者：蒋林树，教授，硕士生导师,E-mail： kjxnb@vip.sina.com;熊本海，教授，博士生导师，E-mail： xiongbenhai@caas.cn

达到稳定 pH 的作用[1]。同时原虫还能抑制氢气和氨态氮的产生。因此，选择科学、有效的饲料添加剂改变瘤胃原虫区系进而调控瘤胃发酵是提高奶牛饲料转化率，改善乳品质的重要环节。

茶皂素，又称茶皂苷，是一种从茶树种子（茶籽、茶叶籽）中提取的五环三萜类糖甙化合物，由 7 种配基、4 种糖体和 2 种有机羧酸组成[1]。茶皂素既是天然的表面活性剂，也是天然的反刍动物瘤胃发酵调控剂，有研究表明，茶皂素可以改善反刍动物生产性能[2]。王洪荣等[3]研究报道，在山羊饲粮中添加茶皂素和丝兰皂苷混合物可降低瘤胃液原虫数量、pH 及乙酸/丙酸。Zhou[4]研究表明，反刍动物饲粮中添加茶皂素，对瘤胃中总挥发性脂肪酸（TVFA）产量没有显著变化，但是可显著降低甲烷产量。来海良等[5]研究报道，在奶牛饲粮中添加茶皂素可降低原虫的存活率。Hu 等[6]通过体外试验表明，在 30 mL 发酵液中添加 8 mg 茶皂素，瘤胃中原虫数量减少了 79%。严淑红等[7]了添加 20、30、40 g/(头·d)茶皂素组与对照组相比均显著降低了瘤胃中原虫数量，并且随着茶皂素添加水平的增加，瘤胃中原虫数量呈线性和二次降低。目前对茶皂素抑制原虫增殖的报道较多[8-9]，但是对其所抑制原虫的种类报道较少，本文将通过聚丙烯酰氨凝胶电泳（DGGE）技术结合 18S rDNA 序列分析研究茶皂素对奶牛瘤胃原虫区系的影响，揭示茶皂素在瘤胃发酵中作用机制，为茶皂素在奶牛养殖中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

茶皂素购自浙江东方茶叶有限公司常山分公司，主要活性成分为五环三萜皂甙，其皂甙含量为 60.2%，其他成分含量如下：粗蛋白质 5.5%，粗纤维 26.2%，水分 4.1%、粗灰分 4.0%，pH 为 5.0～6.5。

1.2 试验动物与管理

本研究于 2014 年 8 月至 2014 年 9 月在北京三元绿荷奶牛养殖中心南口二分场进行。试验选取 12 头健康荷斯坦奶牛[体重（550±30） kg，产奶量 35 kg/（头·d），胎次 2~4]，按产奶量、胎次、泌乳期等相近原则随机分为 4 组，每组 3 头。试验期间，基础饲粮参考牛场的全混合日粮(TMR)饲喂方案，日饲喂和挤奶各 3 次（07：30、14：30、21：30），自由运动和饮水。基础饲粮组成及营养水平表见表 1。

表 1 基础饲粮组成及营养水平(干物质基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
青贮玉米 Corn silage	46.30
玉米 Corn	9.88
膨化大豆 Extrude d soybean	3.00
苜蓿草 Alfalfa hay	6.90
燕麦草 Oat grass	2.40
玉米干酒糟及其可溶物 Corn DDGS	4.40
玉米皮粉 Corn bran powder	3.70
甘蜜素 Sodium cyclamate	2.40
能量增强剂 Energy enhancer[1)]	0.90
压片玉米 Flaked corn	4.40
麦麸 Wheat bran	2.66
燕麦 Oat	1.50
大麦 Barley	2.66
豆粕 Soybean meal	5.10
棉籽粕 Cottonseed meal	1.07
石粉 Limestone	0.68
食盐 NaCl	0.37
小苏打 $NaHCO_3$	0.59
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	0.79
预混料 Premix[2)]	0.30
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[3)]	
泌乳净能 NE_L/（MJ/kg）	7.36
粗脂肪 EE	5.00
粗蛋白质 CP	17.40
酸性洗涤纤维 ADF	16.60
中性洗涤纤维 NDF	31.10
钙 Ca	0.78
磷 P	0.44

1)主要成分为脂肪酸钙 Main composition was fatty acid calcium.

2)预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of diets：Fe 3 000 mg，Cu 4 560 mg，Mn 4 590 mg，Zn 12 100 mg，Se 200 mg，I 270 mg，Co 60 mg，VA 2 000 000 IU，VD_3 450 000 IU，VE 10 000 IU，烟酸 nicotinic acid 3 000 mg。

3)泌乳净能为计算值，其他营养水平为实测值。NE_L was a calculated value, while other nutrient levels were measured values.

1.3 试验设计

各组均饲喂基础饲粮。由于茶皂素适口性差，试验牛不能固定采食，因此选择每天晨饲前口腔灌服茶皂素。预先将 20、30、40 g 茶皂素分别溶于 200 mL 水中。各组分别于晨饲前通过口腔灌服 0（对照）、20、30、40 g/（头·d）茶皂素。整个试验期共 49 d，其中预试期 14 d，正试期 35 d，每天记录产奶量，正试期内每 7 d 采集奶样并于晨饲前 1 h 采集瘤胃液。

1.4 样品采集和测定

1.4.1 乳样采集和测定

正试期内每 7 d 采集奶样，按 4:3:3 将早、中、晚采集的乳样混匀，送至北京三元奶牛中心，采用 LACTOSCAN 型全自动超声波乳成分分析仪测定乳成分。

1.4.2 瘤胃液的采集

正试期内每 7 d 晨饲前 1 h 用口腔采样器采集瘤胃液，过 4 层纱布过滤后将瘤胃液存入液氮中用于瘤胃发酵指标及瘤胃原虫区系的测定。

1.4.3 瘤胃微生物总 DNA 的提取

采用珠磨-十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取瘤胃微生物总 DNA[9]，取 1.5 mL 瘤胃液 1 000×*g* 离心弃上清液，加入 800 μL CTAB 和灭菌锆珠（0.3 g 0.1 mm 和 0.1 g 0.5 mm）后置于珠磨仪上破碎 2 min，70 ℃水浴 20 min 后 13 000×*g* 离心 10 min，取 500 μL 上清液与 500 μL 饱和酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）混合后 13 000×*g* 离心 10 min，取 300 μL 上清液与 280 μL 异丙醇混匀后室温静置 5 min 沉淀 DNA，离心后用 TE 缓冲液溶解 DNA，用微量紫外可见分光光度计测定提取的总 DNA 浓度和纯度，-20 ℃保存。

1.4.4 瘤胃原虫 PCR

以瘤胃微生物总 DNA 为模板，利用一对原虫通用引物 GC-1617R(带 GC 夹子)和 1320F 扩增原虫。引物 GC-1617R 序列为:5′-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCCCGCCCGGGGCCAATTGCAAAGATCTATCC-3′(灰底标注为 GC 夹子)和引物 1320F 序列为:5′-GGTGGTGCATGGCCG-3′[10]。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

PCR 反应体系为 50 μL，包括 25 μL Premix Taq™(Ex Taq™ Version 2.0)，GC-1617R、1320F 各 1 μL，模板 DNA 1 μL，灭菌双蒸水 22 μL。PCR 程序：94 ℃预变性 4 min；94 ℃

变性 30 s，62 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 30 s，40 个循环；72 ℃ 延伸 5 min[11]。用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.4.5 瘤胃原虫的 DGGE

对瘤胃原虫 PCR 产物进行 DGGE 分析。DGGE 使用 8%的丙烯酰胺凝胶，变性梯度（甲酰胺和尿素）为 30%~50%；电泳条件为 80 V 15 h。电泳结束后，进行 GelGreen 染色，用凝胶成像仪观察并拍照。

1.4.6 DNA 回收及克隆测序

从 DGGE 图谱中选择特异条带切胶后采用煮沸法回收 DNA[12]。利用不带 GC 夹子的引物 1617R 和 1320F 进行 PCR 扩增，扩增产物用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA 试剂盒纯化后，插入 PMD-18T 载体并转化入大肠杆菌（*E.coli*）JM109。挑取阳性克隆经生工生物工程（北京）股份有限公司进行测序，测序所得结果与 GenBank 中 KGHL、KI 和 RDP 数据库的序列进行比对。

1.5 数据统计与分析

运用 Quantity One 软件分析 DGGE 图谱，采用非加权算术平均法（unweighted pair group method with averaging alogorithm,UPGMA）进行聚类分析。多样性指数计算公式如下：

$$H=-\Sigma[(n_i/n)\ln(n_i/n)];$$

$$R=S;$$

$$E=H/\ln S;$$

$$C=\Sigma(n_i/n)2。$$

式中：H 为香农指数（Shannon index）；n_i 为条带 i 的峰密度值，n 为泳道中所有条带的峰密度值之和；R 为丰富度指数（richness index）；S 为总条带数；E 为均一性指数（evenness index）；C 为优势度指数（dominance index）。

使用 MEGE 5.10 软件制作序列系统发育树，用 Excel 软件整理试验数据，使用 SPSS 17.0 软件的 one-way ANOVE 法进行单因素方差分析，使用 Duncan 氏法进行平均值的多重比较，$P<0.05$ 为差异显著性判定标准。

2 结 果

2.1 茶皂素对奶牛产奶量和乳成分的影响

由表 2 可见，20、30 g/(头·d)茶皂素组与对照组相比，产奶量和乳脂校正乳产量均没有显著差异（P>0.05）；40 g/(头·d)茶皂素组与对照组相比，显著降低了产奶量和乳脂校正乳产量（P<0.05）；随着茶皂素添加水平的增加，产奶量和乳脂校正乳产量呈二次变化，即呈先增加后减少的趋势，其中 30 g/(头·d)茶皂素组与对照组相比，产奶量和乳脂校正乳产量分别提高了 4.47%和 9.63%。20、30、40 g/(头·d)茶皂素组与对照组相比，乳蛋白率、乳脂率、乳尿素氮含量和乳体细胞数均没有显著变化（P>0.05）；随着茶皂素添加水平的增加乳脂率呈线性增加（P=0.041）、乳体细胞数呈线性降低（P=0.045）；与对照组相比，20、30、40 g/(头·d)茶皂素组的乳脂率分别升高了 2.69%、9.43%、12.46%，乳尿素氮含量分别降低了 10.65%、5.35%、2.41%，30 g/(头·d)茶皂素组的乳体细胞数降低了 7.99%；20、30、40 g/(头·d)茶皂素组与对照组相比乳糖率均显著降低（P>0.05），且随着添加水平的增加，降低程度加大。

表 2 茶皂素对奶牛产奶量和乳成分的影响

Table 2 Effects of tea saponin on milk yield and milk composition of dairy cows

项目 Items	茶皂素添加水平 Tea saponion supplemental levels/[g/(头·d)]				P 值 P-value	线性 Linear	二次 Quadratic
	0	20	30	40			
产奶量 Milk yield/[kg/(头·d)]	36.70±3.67^{b}	37.42±6.66^{b}	38.34±2.18^{b}	28.59±6.94^{a}	<0.001	0.066	0.033
乳脂校正乳产量 FCM yield/[kg/(头·d)]	31.06±4.48^{b}	32.35±7.96^{b}	34.05±4.28^{b}	25.38±4.92^{a}	<0.001	0.089	0.025
乳脂率 Milk fatcontent/%	2.97±0.51	3.05±0.74	3.25±0.64	3.34±0.53	0.236	0.041	0.126
乳蛋白率 Milk protein content/%	2.76±0.18	2.79±0.12	2.86±0.30	2.77±0.21	0.556	0.648	0.517
乳糖率 Lactose content/%	5.19±0.16^{b}	4.98±0.24^{a}	4.97±0.28^{a}	4.82±0.17^{a}	<0.001	0.001	0.003
乳尿素氮含量 Milk urea nitrogen content/%	17.00±3.11	15.19±1.26	16.09±2.59	16.59±4.09	0.296	0.914	0.257
乳体细胞数 Milk SCC/（10^3 个/mL）	47.03±1.31	44.80±3.50	43.27±3.26	46.97±3.86	0.185	0.045	0.059

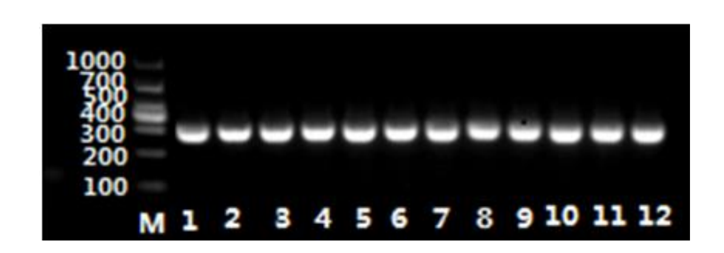
同行数据肩标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)，不同大写字母表示差异极显著(P<0.01)，相同或无字母表示差异不显著(P>0.05)。下表同。

Values in the same row with different small superscripts mean significant difference (P<0.05), while with different capital letter superscripts mean significant difference (P<0.01), while with the same or no letter superscripts mean significant difference (P>0.05). The same as below.

2.2 茶皂素对奶牛瘤胃原虫区系的影响

2.2.1 瘤胃原虫 18S rDNA 扩增后 PCR 产物电泳图谱

奶牛瘤胃原虫 18S rDNA 的 PCR 产物经凝胶电泳检测后所得的电泳图谱如图 1 所示。由图可见，扩增条带唯一，大小在 290 bp 左右，与引物设计片段大小一致。



M：DNA 分子质量标准；1、2、3：对照组；4、5、6：20 g/(头·d)茶皂素组；7、8、9：30 g/(头·d)茶皂素组；10、11、12：40 g/(头·d)茶皂素组。

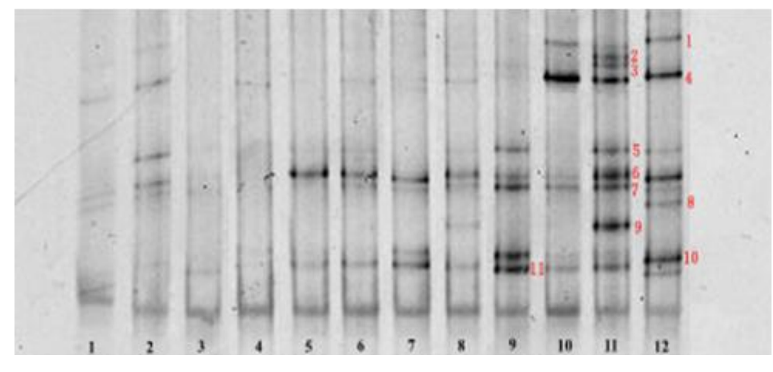
M: DNA molecular weight marker, lanes 1, 2 and 3: control group; lanes 4, 5 and 6: 20 g/(head·d) tea saponin group; lanes 7, 8 and 9: 30 g/(head·d) tea saponin group; lanes 10, 11 and 12: 40 g/(head·d) tea saponin group.

图 1 瘤胃原虫的 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis figure of PCR amplification products of rumen protozoa

2.2.2 瘤胃原虫 DGGE 图谱

奶牛瘤胃原虫区系 18S rDNA 的 DGGE 图谱如图 2 所示。由图可见，20、30、40 g/(头·d)茶皂素组的条带数均少于对照组。在 DGGE 图谱上从上至下将优势条带编号（1～11），部分优势条带在 20、30、40 g/(头·d)茶皂素组丰度减弱或者消失。从瘤胃原虫 DGGE 图谱中显示原有部分优势条带变弱或消失，说明添加茶皂素可以选择性地抑制瘤胃中原虫的生长。



1、2、3：40 g/(头·d)茶皂素组；4、5、6：30 g/(头·d)茶皂素组；7、8、9：20 g/(头·d)茶皂素组；10、11、12：为对照组。下图同。

批注 [W1]: 第一列数字上方补 bp

Lanes 1, 2 and 3: 40 g/(head·d) tea saponin group; lanes 4, 5 and 6: 30 g/(head·d) tea saponin group; lanes 7, 8 and 9: 20 g/(head·d) tea saponin group; lanes 10, 11 and 12: control group. The same below.

图 2 瘤胃原虫 DGGE 图谱

Fig.2 DGGE electrophoresis figure of rumen protozoa

2.2.3 对奶牛瘤胃原虫多样性指数的影响

根据瘤胃原虫 DGGE 图谱分析所得的结果进一步分析香农多样性指数、丰富度指数、均一性指数、优势度指数，结果如表 3 所示。由表可见，30、40 g/(头·d)茶皂素组的丰富度指数和香农多样性指数都显著低于对照组（$P<0.05$）；20 g/(头·d)茶皂素组的丰富度指数和香农多样性指数都低于对照组，但未达到显著差异（$P>0.05$）；随着茶皂素添加水平的增加，香农指数（$P=0.003$）和丰富度指数($P=0.012$)均呈线性降低，丰富度指数同时呈二次降低($P=0.016$)；30、40 g/(头·d)茶皂素组的优势度指数显著高于对照组（$P<0.05$），20 g/(头·d)茶皂素组的优势度指数低于对照组，但未达到显著差异（$P>0.05$）；随着茶皂素添加水平的增加，优势度指数呈线性增加($P=0.042$)；20、30、40 g/(头·d)茶皂素组的均一性指数与对照组相比差异不显著（$P>0.05$）。

表 3 茶皂素对奶牛瘤胃原虫多样性指数的影响

Table 3 Effects of tea saponin on rumen protozoa diversity indexes of dairy cows

项目 Items	茶皂素添加水平 Tea saponion supplemental levels/[g/(头·d)]				*P* 值 *P*-value	线性 Linear	二次 Quadratic
	0	20	30	40			
丰富度指数 Richness index	8.00±1.15[b]	6.33±0.33[ab]	3.00±1.00[a]	3.67±0.88[a]	0.014	0.003	0.016
香农指数 Shannon index	2.04±0.15[c]	1.82±0.05[bc]	0.99±0.30[a]	1.22±0.27[ab]	0.029	0.012	0.052
优势度指数 Dominance index	0.13±0.04[a]	0.16±0.01[a]	0.41±0.17[b]	0.32±0.16[b]	0.050	0.042	0.141
均一性指数 Evenness index	0.99±0.01	0.99±0.00	0.99±0.01	0.99±0.00	0.836	0.982	0.662

2.2.4 瘤胃原虫相似性指数

奶牛瘤胃原虫 DGGE 图谱的相似性指数如图 3 所示。由图可见，不同添加水平茶皂素组的瘤胃原虫区系的相似性指数在 0.28～0.89，个体间差异相对较大。

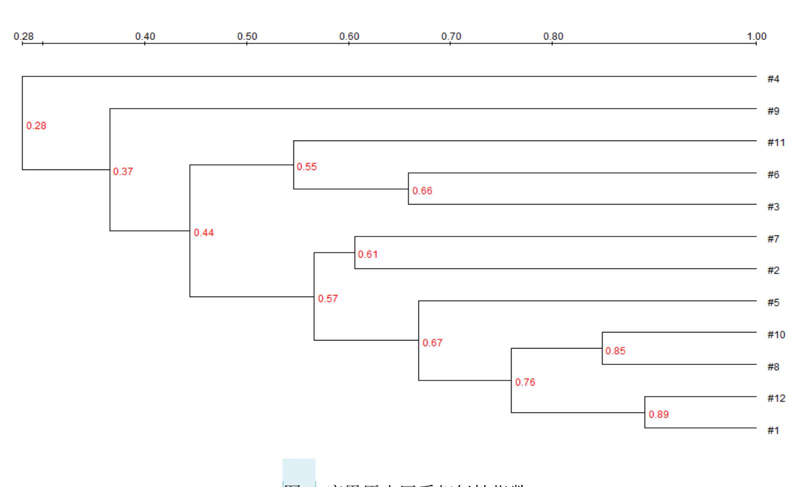


图 3 瘤胃原虫区系相似性指数

批注 [W2]: 最右侧数字前的#删掉
数字上方补 条带 Band

Fig.3 Similarity index of rumen protozoa flora

2.2.5 瘤胃原虫 DNA 序列比较及进化树分析

从奶牛瘤胃原虫 DGGE 电泳中割胶回收的 1～11 号条带经连接、克隆和测序后，所获得 16S rDNA 序列进行 Blast 比对所得结果如表 4 所示。由表可见，经测序后所得的序列提交 GenBank 收录，所得登录号为 KU355836～KU355846。使用 MEGA 5.10 软件将已知原虫序列和克隆的序列进行系统发育进化树分析，结果如图 4 所示。由序列比对结果和系统发育进化树可以看出，饲粮中添加茶皂素主要影响前庭亚纲内毛目的原虫。

表 4 茶皂素对瘤胃原虫 DGGE 差异条带序列比对结果

Table 4 Effcets of tea saponin on rumen protozoa DGGE differential band sequence alignment results

条带 Band	登录号 Accession No	菌门 Bacterial phyla	最相似菌（GenBank 编号） The closest bacteria (GenBank number)	相似度 Similarity/%
1	KU355836	毛口目 Trichostomatida	肠等毛虫 *Isotricha prostoma* （AM158456）	100
2	KU355837	毛口目 Trichostomatida	肠纤毛菌 *Isotricha intestinalis* (AM158441)	100
3	KU355838	内毛目 Entodiniomorphida	内毛虫 *Entodinium bursa* (AM158448)	99
4	KU355839	内毛目 Entodiniomorphida	*Entodinium furca monolobum* (AM158471)	100
			尾状内毛虫 *Entodinium caudatum* (AM158447)	100
5	KU355840	内毛目 Entodiniomorphida	尾状内毛虫 *Ophryoscolex caudatus* (AM158467)	100
6	KU355841	内毛目 Entodiniomorphida	*Polyplastron multivesiculatum* (AM158458)	100
7	KU355842	内毛目 Entodiniomorphida	尖尾内旋纤毛虫 *Entodinium caudatum* (AM158446)	99
8	KU355843	内毛目 Entodiniomorphida	尾状前毛虫 *Epidinium ecaudatum caudatum* (AM158474)	99
9	KU355844	内毛目 Entodiniomorphida	束状前毛虫 *Epidinium ecaudatum fasciculus* (AM158465)	100
10	KU355845	内毛目 Entodiniomorphida	*Diploplastron affine* （AM158457）	100
11	KU355845	内毛目 Entodiniomorphida	杜巴德内旋纤毛虫 *Entodinium dubardi* （AM158443）	100

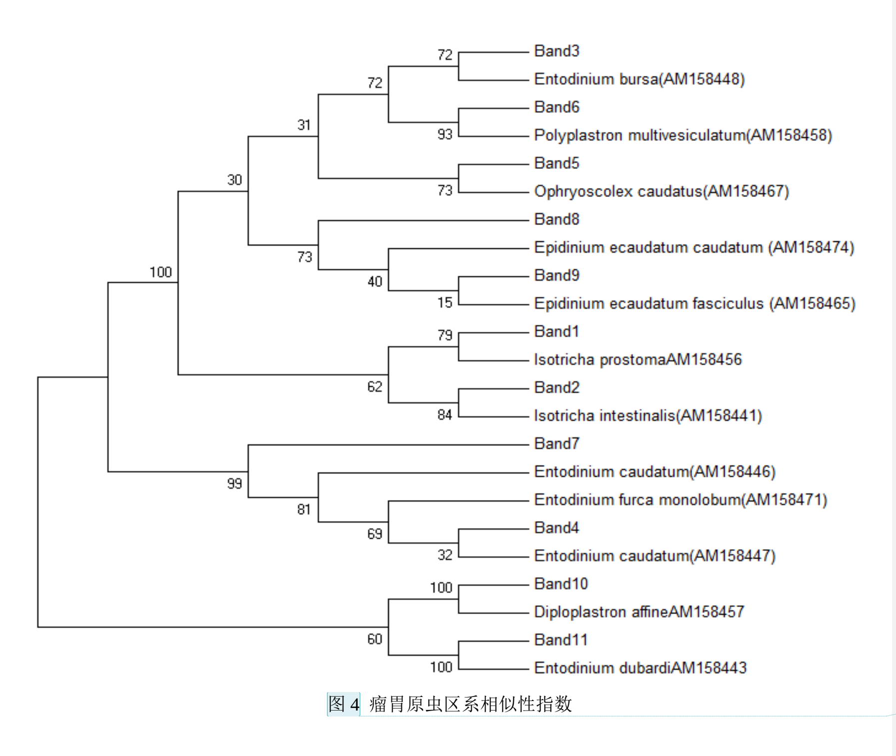


图 4 瘤胃原虫区系相似性指数

Fig.4 Similarity index of rumen protozoa flora

批注 [W3]:
条带 3 Band 3
内毛虫 *Entodinium bursa* (AM158448)
条带 6 Band 6
Polyplastron multivesiculatum (AM158458)
条带 5 Band 5
尾状内毛虫 *Ophryoscolex caudatus* (AM158467)
条带 8 Band 8
尾状前毛虫 *Epidinium ecaudatum caudatum* (AM158474)
条带 9 Band 9
束状前毛虫 *Epidinium ecaudatum fasciculus* (AM158465)
条带 1 Band 1
肠等毛虫 *Isotricha prostoma* （AM158456）
条带 2 Band 2
肠纤毛菌 *Isotricha intestinalis* (AM158441)
条带 7 Band 7
尖尾内旋纤毛虫 *Entodinium caudatum* (AM158446)
Entodinium furca monolobum (AM158471)
条带 4 Band 4
尾状内毛虫 *Entodinium caudatum* (AM158447)
条带 10 Band 10
Diploplastron affine （AM158457）
条带 11 Band 11
杜巴德内旋纤毛虫 *Entodinium dubardi* （AM158443）

3 讨 论

严淑红等[7]研究表明，添加不同水平的茶皂素显著降低了瘤胃液pH、氨态氮的浓度，但均未超过正常范围值，且显著提高了微生物蛋白、丙酸和丁酸浓度，但对TVFA和乙酸浓度的影响不显著。

本研究运用 DGGE 技术结合 18S rDNA 序列分析技术研究添加茶皂素后奶牛瘤胃原虫的多样性和组成结构的变化。运用 DGGE 结合 18S rDNA 序列分析技术主要是因为 DGGE 存在一定的局限性，但是如果能够与基因克隆、序列分析等方法有效结合则可以获取更完整的信息。有研究表明，添加茶皂素能够降低瘤胃内原虫的数量[13-15]。本研究结果表明，添加茶皂素可以选择性地抑制瘤胃中部分原虫的生长，由序列对比可知，茶皂素主要影响的是前庭亚纲内毛目原虫，可能因为 DGGE 只能检测优势原虫，所以有很多原虫都没有在图谱中表示出来。进一步分析奶牛瘤胃原虫多样性指数，发现茶皂素对其影响显著，说明茶皂素不仅对瘤胃原虫数量有影响，而且也影响原虫区系的多样性，这可能是因为茶皂素

影响了瘤胃细菌的多样性，而细菌和原虫又存在互作用[16]，最终影响了瘤胃原虫的多样性。Wallace 等[14]研究表明，茶皂素可以通过与瘤胃原虫表面的胆固醇复合，来杀死瘤胃原虫，所以可能是因为瘤胃原虫表面胆固醇的组成成分不一样，导致茶皂素只能与部分原虫结合，最终改变了瘤胃原虫的多样性。该结果与很多学者的研究结果相似，如陈旭伟[17]研究表明，体外瘤胃发酵中添加不同水平的茶皂素能够抑制瘤胃原虫的生长，并且原虫的种属比例也发生相应变化，其中双毛虫的比例上升而内毛虫的比例下降，添加 0.6%的茶皂素与对照组相比差异极显著；与周奕毅[18]的研究结果也相似。

4 结 论

饲粮中添加 30、40 g/(头·d)茶皂素均可抑制奶牛瘤胃原虫的生长，并且降低瘤胃原虫的多样性。

参考文献：

[1] JOHNSON K,HUYLER M,WESTBERG H,et al.Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique[J].Environmental Science & Technology,1994,28(2):359–362.

[2] WANG J K,YE J A,LIU J X.Effects of tea saponins on rumen microbiota,rumen fermentation,methane production and growth performance—a review[J].Tropical Animal Health and Production,2012,44(4):697–706.

[3] 王洪荣,陈旭伟,王梦芝.茶皂素和丝兰皂苷对山羊人工瘤胃发酵和瘤胃微生物的影响[J].中国农业科学,2011,44(8):1710–1719.

[4] ZHOU Y Y,MAO H L,JIANG F,et al.Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep[J].Animal Feed Science and Technology,2011,166–167:93–100.

[5] 来海良,王一义.茶皂素对湖羊瘤胃培养物发酵的影响[J].现代农业科技,2010(23):300,302.

[6] HU W L,LIU J X,YE J A,et al.Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*[J].Animal Feed Science and Technology,2005,120(3/4):333–339.

[7] 严淑红,赵士萍,蒋琦晖,等.茶皂素对奶牛瘤胃发酵及瘤胃微生物区系的影响[J].动物营养学报,2016,28(8):2485–2496.

[8] 苑文珠,叶均安,刘建新.瘤胃原虫对反刍动物的影响[J].饲料博览,2002(1):17–18.

[9] 郭嫣秋.瘤胃产甲烷菌定量检测与微生物菌群调控研究[D].博士学位论文.杭州:浙江大学,2008.

[10] SYLVESTER J T,KARNATI S K R,YU Z T,et al.Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR[J].The Journal of Nutrition,2005,134(12):3378–3384.

[11] SYLVESTER J T,KARNATI S K R,YU Z,et al.Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen[J].Journal of Dairy Science,2005,88(6):2083–2095.

[12] 陈亮明,张冬林,李志辉,等.PAGE 银染和条带回收方法的改进[J].中南林业科技大学学报,2007,27(6):163–165.

[13] 郭兴凤,阮丽红,谈天.茶皂苷对大豆蛋白发泡能力影响研究[J].河南工业大学学报：自然科学版，2009,30(3):12–15.

[14] WALLACE R J,MCEWAN N R,MCINTOSH F M,et al.Natural products as manipulators of rumen fermentation[J].Asian-Australasian Journal of Animal Sciences,2002,15(10):1458–1468.

[15] DIAZ A,AVENDANO M,ESCOBAR A.Evaluation of *Sapindus saponaria* as a defaunating agent and its effects on different rumen digestion parameters[J].Livestock Research for Rural Development,1993,5(2):5560.

[16] 付琦.不同精粗比下驱除原虫对绵羊瘤胃微生物区系及饲料降解的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.

[17] 陈旭伟.不同皂苷对山羊瘤胃原虫和细菌种属变化以及纤维降解的影响[D].硕士学位论文.扬州:扬州大学,2009.

[18] 周奕毅.茶皂素抑制湖羊甲烷生成的微生物学机制研究[D].硕士学位论文.杭州:浙江大学,2009.

Effects of Tea Saponin on Rumen Protozoa Flora of Dairy Cows

ZHAO Shiping[1] YAN Shuhong[1] JIANG Qihui[1] CHANG Xiaoxiao[1] WANG Bing FANG Luoyun[1] JIANG Linshu[1*] XIONG Benhai[2*]

(1. *Key Laboratory for Dairy Cow Nutrition of Beijing, College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing* 102206, *China*； 2. *Institute of Animal Science*， *Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193, *China*)

Abstract: The objective of this study was to research the effects of tea saponin on rumen protozoa flora of dairy cows. Twelve healthy Holstein dairy cows [body weight was (550±30) kg; milk yield was 35 kg/(head·d); 2 to 4 parities] were randomly allocated to one of four groups with 3 cows per group. Tea saponin [0 (control), 20, 30 and 40 g/(head·d)] was perfused to cows before morning feeding. The experiment lasted for 49 d with 14 d of adaptation period and 35 d of formal test period. Rumen fluid was collected by mouth sampler at 1 h before morning feeding every 7 d during formal test period. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) combined with 18S rDNA sequence analysis technique was used for rumen protozoa flora analysis. The results showed as follows: 1) tea saponins could selectively inhibit protozoa growth. 2) Compared with control group, richness index and Shannon index in 30 and 40 g/(head·d) tea saponins groups were significantly reduced (P<0.05), and dominance index was significantly increased (P<0.05), but evenness index was not significantly different among groups (P>0.05); tea saponin could significantly reduce rumen Vestibuliferia Entodiniomorphida protozoa number. In conclusion, dietary supplementation of 30 and 40 g/(head·d) tea saponins can inhibit protozoa growth in rumen of dairy cows, and reduce the diversity of rumen protozoa.

Key words: dairy cow; protozoa flora; tea saponin

*Corresponding authors: JIANG Linshu, professor, E-mail： kjxnb@vip.sina.com; XIONG Benhai, professor, E-mail： xiongbenhai@caas.cn (责任编辑 王智航)